



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA

**RELAÇÃO DE GÊNERO E DOSE NOS EFEITOS METABÓLICOS E DE
DEPOSIÇÃO DE MANGANÊS (Mn) E FERRO (Fe) APÓS EXPOSIÇÃO
INTRAPERITONAL À MANGANÊS EM RATOS ADULTOS**

ADRIANA TIEMI YAMAGATA

BRASÍLIA, DF

2015

ADRIANA TIEMI YAMAGATA

**RELAÇÃO DE GÊNERO E DOSE NOS EFEITOS METABÓLICOS E DE
DEPOSIÇÃO DE MANGANÊS (Mn) E FERRO (Fe) APÓS EXPOSIÇÃO
INTRAPERITONAL À MANGANÊS EM RATOS ADULTOS**

Monografia de conclusão de curso
apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau Farmacêutico, na
Universidade de Brasília, Faculdade de
Ceilândia.

Orientadora: Profa. Dra. Vívian da Silva Santos

BRASÍLIA, DF

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Yamagata, Adriana T.

Relação de gênero e dose nos efeitos metabólicos e de deposição de Manganês (Mn) e Ferro (Fe) após exposição intraperitoneal à Manganês em ratos adultos / Adriana Tiemi Yamagata; orientadora Vívian da Silva Santos – Brasília, 2015.

37 f.

Monografia (Graduação em Farmácia) -- Faculdade de Ceilândia –Universidade de Brasília, 2015.

1.Manganês. 2.Ferro. 3.Gênero. 4.Dose. 5. Neurotoxicidade. 6.Análises Bioquímicas

ADRIANA TIEMI YAMAGATA

**RELAÇÃO DE GÊNERO E DOSE NOS EFEITOS METABÓLICOS E DE
DEPOSIÇÃO DE MANGANÊS (Mn) E FERRO (Fe) APÓS EXPOSIÇÃO
INTRAPERITONAL À MANGANÊS EM RATOS ADULTOS**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vivian da Silva Santos (Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia)
Orientadora

Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferreira (Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia)

Prof. Dr. Rodrigo Haddad (Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia)

BRASÍLIA, DF

2015

*Dedico esse trabalho à minha
avó Misako Yamagata (in
memorian) pelo exemplo de
ser humano que foi a mim.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por guiar todos os meus passos e nunca me deixar desistir dos meus sonhos.

Aos meus pais José Luiz Yamagata e Terumi Akaoka Yamagata, e meu irmão Luiz Keniti Yamagata, que durante toda a minha vida me apoiaram em minhas decisões, e, ao longo da graduação não mediram esforços para que eu concluísse o curso, compreendendo meus momentos de tristeza e me dando forças para prosseguir com o curso.

Aos demais familiares, em especial ao meu Tio Yukio, que me apoiou de diversas formas, sempre preocupado com o meu desempenho na faculdade.

Aos meus amigos, de infância e da faculdade, por todas as brincadeiras e companheirismo ao longo desse período. Das amizades que fiz na faculdade, mantenho um carinho especial pela Christianne Costa, Filipe Almeida e José de Alsimir, que estarão sempre em meu coração.

À meu namorado João Marques, que tanto me apoiou e auxiliou durante a graduação, sendo sempre muito atencioso, paciente e amoroso.

Em especial, agradeço a professora Dra. Vivian, que me acatou com muito carinho na orientação dessa pesquisa, pela dedicação e esforço em realizar um bom trabalho e por toda atenção dada na elaboração deste.

Ao grupo de pesquisa pelo auxílio nas injeções e eutanásias, Diogo Ferreira, Michelly Gonçalves, Matheus Tavares e Isadora Guimarães pela disponibilidade e auxílio nas fases de experimentação.

À Natália Guimarães por toda paciência e atenção que teve comigo ao longo das análises estatísticas, e à Mirella Giovana e Déborah Moraes por me auxiliar nas análises bioquímicas.

À banca, professor Dr. Eduardo Ferreira e professor Dr. Rodrigo Haddad pelo aceite do convite, e por serem exemplos de profissionais a serem seguidos; assim como os demais professores que fizeram parte da minha formação acadêmica.

Ao professor Dr. José Eduardo Pandóssio por me proporcionar a oportunidade de trabalhar com animais, que foi o início de todo esse processo de pesquisa.

À Universidade Católica de Brasília, por ceder o espaço e os animais para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao professor Fernando Barbosa Júnior por disponibilizar o Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, para que as análises de metais pudessem ser realizadas.

À Universidade de Brasília/Faculdade de Ceilândia por proporcionar oportunidades de realizar sonhos e abrir portas para o mundo científico.

Meus sinceros agradecimentos a todos que, de alguma forma, auxiliaram na minha formação e acreditaram em mim.

*“Descobrir consiste em olhar para
o que todo mundo está vendo e
pensar uma coisa diferente”.*

Roger Von Oech

RESUMO

YAMAGATA, A.T. **Relação de gênero e dose nos efeitos metabólicos e de deposição de Manganês (Mn) e Ferro (Fe) após exposição intraperitoneal à Manganês em ratos adultos.** 2015. Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

Apesar de sua essencialidade, o Manganês (Mn) possui efeitos neurotóxicos bem descritos na literatura, no qual doses altas desse elemento e exposição prolongada geram a síndrome denominada manganismo. No presente estudo foi comparado a influência de gênero e dose na exposição intraperitoneal de (MnCl₂) em duas doses – 1 mg/Kg e 5 mg/Kg - por 30 dias ininterruptos, em comparação aos grupos controles expostos a salina (NaCl 0,9%). Foram analisados três dissecados do sistema nervoso central (cerebelo, tronco encefálico e hipocampo), rins e fígado; como também foi feita avaliação de alguns parâmetros bioquímicos. Foi observado que houve dose dependência ao bioacúmulo de Mn no cerebelo e no tronco encefálico para a dosagem de 5 mg/Kg; no hipocampo houve diferença de gênero e dose nos grupos em estudo; e houve aumento de Fe nos grupos expostos ao Mn. Esses dados complementam um estudo prévio realizado com o comportamento desses mesmo animais e demonstra que o excesso de metais nos dissecados cerebrais tem forte influência na memória e aprendizagem e sugere efeitos pró-depressivos, desencadeado pela redução de monoaminas devido ao bioacúmulo excessivo. Mesmo com deposição de Mn significativa no rim e fígado no grupo exposto a Mn 5 mg/Kg, as análises bioquímicas não demonstraram elevação de biomarcadores de danos renais e hepáticos. Conclui-se então que a exposição ao Mn causa deposição do metal em dissecados do SNC, hepáticos e renais, porém os efeitos mais evidentes da intoxicação são os danos neurológicos.

Palavras-chave: manganês, ferro, gênero, dose, neurotoxicidade, análises bioquímicas.

ABSTRACT

YAMAGATA, A.T. **Relação de gênero e dose nos efeitos metabólicos e de deposição de Manganês (Mn) e Ferro (Fe) após exposição intraperitoneal à Manganês em ratos adultos.** 2015. Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

Despite its essentiality, Mn neurotoxic effects have been described in literature at high doses and long-term exposure inducing the syndrome called manganism. The present study compared gender influence and dose in the intraperitoneal MnCl₂ exposure in two doses - 1 mg/kg and 5 mg/kg - for 30 uninterrupted days, compared to control (0.9% NaCl). Three dissected central nervous system (CNS) were analyzed (cerebellum, brainstem and hippocampus), kidneys, and liver; as well it was also done serum biochemical analysis. It observed dose dependence on Mn bioaccumulation in the cerebellum and the brainstem to the dosage of 5 mg/kg, and hippocampus were gender differences and dose in study groups, and an increase of Fe in the groups exposed to Mn. These data corroborates previous study regarding behavior of these same animals and demonstrates that metal excess into the brain dissected has a strong influence on learning and memory process and suggests prodepressive effects triggered by reduction of monoamines. Even with significant Mn deposition in the kidney and liver in the group exposed to Mn 5 mg/kg, biochemical analysis showed no elevation in liver and kidney damage biomarkers. It was concluded that exposure to Mn cause metal deposition dissected CNS, liver and kidney, but the most obvious effects of intoxication is neurological damage.

Keywords: manganese, iron, gender, dose, neurotoxicity, biochemical analysis.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Concentração de Mn e Fe no hipocampo dos grupos estudados..... | 15 |
| Figura 2: Concentração de Mn e Fe no cerebelo dos grupos estudados..... | 17 |
| Figura 3: Concentração de Mn e Fe no tronco encefálico dos grupos estudados.. | 18 |
| Figura 4: Concentração de Mn e Fe no rim dos grupos estudados..... | 20 |
| Figura 5: Concentração de Mn e Fe no fígado dos grupos estudados..... | 22 |
| Figura 6: Concentração de glicose dos grupos estudados..... | 23 |
| Figura 7: Concentração de colesterol dos grupos estudados..... | 24 |
| Figura 8: Concentração de triglicerídeos dos grupos estudados..... | 25 |
| Figura 9: Concentração de uréia e creatinina dos grupos estudados..... | 26 |
| Figura 10: Concentração de TGO e TGP dos grupos estudados..... | 27 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Grupos dos animais utilizados no trabalho | 12 |
|------------------------------------------------------------------|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| ALT | Alanina aminotransferase |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| ANOVA | Análise de variância simples |
| AST | Aspartato aminotransferase |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| ATSDR | Agência de substâncias tóxicas e registros de doenças |
| CCl ₄ | Tetracloroeto de carbono |
| CEUA/UnB | Comissão de ética no uso de animais da Universidade de Brasília |
| DF | Distrito Federal |
| dL | Decilitro |
| DMT1 | Transportador de metal divalente |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| FCFRP-USP | Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo |
| Fe | Ferro |
| g | Gramma |
| GGT | Gama-glutamyltransferase |
| h | Hora |
| ICP-MS | Espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado |
| I.P. | Intraperitoneal |
| I.V | Intravenoso |
| Kg | Quilograma |
| L | Litro |
| m ³ | Metro cúbico |
| mg | Miligramma |
| mL | Mililitro |
| Mn | Manganês |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | Cloreto de manganês (II) tetra hidratado |
| NaCl 0,9% | Cloreto de sódio 0,9% |

| | |
|--------|------------------------------------|
| n | Número |
| NRC | Conselho Nacional em Pesquisa |
| rpm | Rotação por minuto |
| RDC | Resolução da diretoria colegiada |
| SOD | Superóxido dismutase |
| SNC | Sistema nervoso central |
| Tf | Transferrina |
| TfR | Receptores de transferrina |
| TGO | Transaminase glutâmica oxalacética |
| TGP | Transaminase glutâmica pirúvica |
| TMAH | Hidróxido de tetrametilamônio |
| U | Unidades |
| UCB | Universidade Católica de Brasília |
| UV/VIS | Ultravioleta em espectro visível |
| lx | LUX |
| µg | Micrograma |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|----|------------------|
| ± | mais ou menos |
| % | porcentagem |
| ® | marca registrada |
| < | menor que |
| > | maior que |
| °C | graus Celsius |
| ♂ | macho |
| ♀ | fêmea |

SUMÁRIO

1 REVISÃO DA LITERATURA

| | |
|---------------------------------------------------------------------|---|
| 1.1 Essencialidade e toxicidade de metais | 1 |
| 1.2 Manganês como metal essencial..... | 2 |
| 1.3 A toxicidade do elemento Manganês..... | 3 |
| 1.4 Mecanismos de ação do Manganês e sua relação com o Ferro..... | 4 |
| 1.5 Alterações bioquímicas causadas pela exposição do Manganês..... | 5 |
| 1.6 Efeitos da subdose e sobredose de Manganês..... | 6 |
| 1.7 Influência do gênero sobre efeitos do Manganês..... | 7 |

2 JUSTIFICATIVA

9

3 OBJETIVOS

10

3.1 Objetivos Geral

10

3.2 Objetivos Específicos

10

4 MATERIAIS E MÉTODOS

11

4.1 Reagentes

11

4.2 Animais e tratamento.....

11

4.3 Determinação de Mn e Fe, por ICP-MS.....

13

4.4 Análises bioquímicas.....

13

4.5 Estatística.....

13

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....

15

5.1 Deposição de Mn e Fe em dissecados de SNC.....

15

5.1.1 Deposição de Mn e Fe no hipocampo.....

15

5.1.2 Deposição de Mn e Fe no cerebelo e no tronco encefálico.....

17

5.2 Deposição de Mn e Fe em tecidos renais.....

20

5.3 Deposição de Mn e Fe em tecidos hepáticos.....

21

5.4 Análise bioquímica do soro.....

22

5.4.1 Glicose, Colesterol e Triglicerídeos.....

22

5.4.2 Uréia e Creatinina.....

25

5.4.3 TGO e TGP.....

26

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

28

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

29

Anexo I – Aprovação do Projeto em Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA)..

37

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Essencialidade e toxicidade de metais

Os metais são encontrados nos sistemas biológicos desempenhando diversas funções, relacionadas a funções estruturais, estabilizadores de estruturas biológicas, componentes de mecanismos de controle em tecidos nervosos e musculares e estão envolvidos em processos fisiológicos de oxidação e redução (NORDBERG *et al.*, 2007).

Metais essenciais como sódio, potássio, cálcio e magnésio são importantes para o metabolismo humano e estão presentes em grandes quantidades no organismo humano; enquanto cobalto, cobre, ferro, manganês e zinco estão presentes em quantidades vestigiais. O cádmio, mercúrio e chumbo são classificados como metais tóxicos e não possuem função biológica (CAUSSY *et al.*, 2003; SINICROPI *et al.*, 2010).

Metais essenciais são aqueles que estão associados a anormalidades funcionais ou estruturais quando são excluídos da dieta do organismo, e que se relacionam a alterações bioquímicas específicas que podem ser revertidas pela sua administração (BRADHAM; WENTSEL, 2010). Segundo a literatura, diversos metais são essenciais para mecanismos fisiológicos de humanos e animais, sendo parte integrante de estruturas de diversas enzimas participando de suas atividades, dentre eles se pode citar o zinco, ferro, magnésio, manganês, cobre, molibdênio, cromo, cobalto, entre outros (OGA *et al.*, 2003; SANTAMARIA, 2008); sendo que esses em altas concentrações no organismo podem provocar reações tóxicas (CAUSSY *et al.*, 2003).

As propriedades químicas de cada elemento estão relacionadas com seus efeitos biológicos, no qual metais de transição como o ferro e manganês estão envolvidos principalmente em reações de catálise de reações de oxirredução (WRIGHT; BACCARELLI, 2007).

1.2 Manganês como metal essencial

O manganês (Mn) é classificado como metal essencial e é encontrado em quantidades limitadas no organismo humano (concentrações traço), sendo importante para o funcionamento adequado e regulação de diversos processos biológicos (OGA *et al.*, 2003).

Dentre as atividades exercidas pelo Mn, estão envolvidos os processos tais como a produção de adenosina trifosfato (ATP), auxílio no processo de coagulação do sangue e está envolvido em diversos processos enzimáticos (ERIKSON *et al.*, 2007). Além dessas funções, o manganês auxilia no crescimento e desenvolvimento de ossos e cartilagens, tem papel importante no funcionamento do sistema nervoso, imunológico, nos sistemas hormonais reprodutivos (ASCHNER; ASCHNER, 2005). Dentre as funções metabólicas desempenhadas pelo Mn, destaca-se sua importância como cofator para diversas enzimas, sendo elas: (i): enzima antioxidante superóxido dismutase, sendo o cofator da isoenzima 2 que atua na proteção mitocondrial detoxificando ânions superóxido, (ii): cofator de enzimas envolvidas na síntese de neurotransmissores (glutamina sintetase), (iii): ativador de enzimas na gliconeogênese no metabolismo de proteínas e carboidratos (arginase piruvato carboxilase) e (iv) ativador na síntese de mucopolissacarídeos (glicosiltransferase) utilizados em cartilagens e ossos (ASCHNER *et al.*, 2007; ERIKSON *et al.*, 2007; SANTAMARIA, 2008).

O Mn está amplamente distribuído no meio ambiente, presente na água, solo, alimentos (PERL; OLANOW, 2007); como também faz parte da matéria-prima nas indústrias de insumos agrícolas, materiais de mecânica e mineração (GERBER, *et al.*, 2002). No entanto, a via de exposição mais comum ao Mn é a alimentação, estando presente em nozes, cereais, legumes, frutas, grãos e chás (SANTAMARIA, 2008). De acordo com WHO (1999), os alimentos onde são encontradas maiores concentrações de Mn são: grãos (acima de 41 µg/g), noz (acima de 47 µg/g) e cereais (acima de 41 µg/g). A dose de referência do Mn em alimentos é de 0,14 mg/Kg/dia (EPA, 2000) ou 10 mg para um adulto de aproximadamente 70 quilos (GREGER, 1998).

De acordo com o Conselho Nacional de Pesquisa (NRC) de Washington (1989), as necessidades diárias de Mn na dieta são de 2-5 mg/dia para adultos e de

1-3 mg/dia para crianças. Já no Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 269 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que aborda o “Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada de proteína, vitaminas e minerais”, recomenda que um adulto faça a ingestão de 2,3 mg de Mn por dia.

1.3 A toxicidade do elemento Manganês

O Mn tende a estar distribuído por todos os tecidos do corpo humano, todavia, estudos demonstram que tecidos cerebrais e hepáticos possuem concentrações mais altas devido à maior concentração de mitocôndrias nesses tecidos (devido à elevada demanda energética desses tecidos); e isso se justifica pelo fato do manganês ser cofator principal para a função do radical ânion superóxido da enzima antioxidante superóxido dismutase mitocondrial (SOD) (ASCHNER; ASCHNER, 2005).

Estudos revelam que a deficiência de Mn no organismo é muito rara e está associada a perda de peso e dificuldade na coagulação sanguínea (ERIKSON *et al.*, 2007). O excesso de Mn está associado a distúrbios neuropsiquiátricos, e em especial ao manganismo. O manganismo é uma disfunção motora causada pela maior deposição de Mn em estruturas do Sistema Nervoso Central, especialmente nos núcleos da base. As formas mais graves de manganismo provocam contrações musculares prolongadas, com rigidez e tremores (DOBSON *et al.*, 2004); instabilidade postural e distúrbios na fala (KRISHNA *et al.* 2013), assemelhando-se à Doença de Parkinson em humanos. Além disso, estudos recentes em humanos demonstram que o excesso de manganês tem provocado distúrbios emocionais, como ansiedade e/ou depressão (BOWLER *et al.*, 2003; LAOHAUDOMCHOK *et al.*, 2011; O'NEAL *et al.*, 2014).

Os sintomas provocados pelo excesso de Mn biodisponível pode ser explicado devido a deposição de Mn em neurônios dopaminérgicos, desencadeando reações de auto-oxidação da dopamina endógena livre, levando à morte celular (ARCHIBALD; TYREE., 1987; TAKEDA 2003).

Nesse sentido, mais estudos foram realizados para avaliar a redução da dopamina estriatal devido ao excesso de Mn. Mustafa e Chadra (1971) observaram

a redução de dopamina em coelhos e em seguida Bird e colaboradores (1984) conduziram estudos com primatas e observaram que houve também a redução de dopamina em seu grupo experimental assim como Dorman e colaboradores (2000) e Liu (2006) que realizaram os testes em ratos e camundongos e verificaram também a redução de dopamina.

Em 2012, Sanchez-Betancourt e colaboradores realizaram um experimento cujo objetivo era observar se houve dano motor após exposição inalatória à uma mistura contendo cloreto de manganês e acetato de manganês, na concentração de 2,676 mg/m³. O teste foi realizado uma vez na semana, por seis meses; e o resultado que obtiveram foi que ao longo da exposição, os animais adquiriram danos motores, houve perda de neurônios dopaminérgicos e não houve alterações celulares no estriado.

Sobre a janela toxicológica do Mn, a literatura relata que os mamíferos possuem mecanismos regulatórios que mantêm o Mn em concentrações homeostáticas no corpo, mantendo o equilíbrio desse metal a fim de evitar a falta ou o excesso. A homeostasia é mantida pelo equilíbrio entre a absorção e a eliminação dos excessos via hepatobiliar (ABRAMS *et al.*, 1976), que sendo uma via de eliminação rápida limita sua toxicidade após altas doses (BARCELOUX, 1999; SANTAMARIA, 2008).

1.4 Mecanismos de ação do Manganês e sua relação com o Ferro

O mecanismo neurotóxico do Mn não está totalmente estabelecido na literatura. Entretanto, estudos mostram que o Mn provoca alterações nas funções mitocondriais, prejudicando a fosforilação oxidativa, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) que pode provocar apoptose ou necrose da célula (GUNTER *et al.*, 2006).

Hardy e Gillanderns (2008), observaram em seus estudos que em indivíduos saudáveis, aproximadamente 5% do manganês ingerido via oral é absorvido, além disso, diversos estudos vêm sendo conduzidos no intuito de observar os mecanismos pelos quais o manganês circula pelo organismo até chegar ao órgão alvo e se depositar. Em seus estudos, Erikson e colaboradores (2007) e Fitsanakis e

colaboradores (2010) sugerem que, o influxo de Mn para o sistema nervoso central (SNC) aconteça por intermédio de transportadores, mas seu efluxo é controverso.

Na etapa de excreção do Mn, primeiramente ele é removido do sangue e depois é secretado no intestino; e uma pequena fração é reabsorvida. A literatura sugere que o mecanismo de eliminação do Mn seja através do sistema hepatobiliar (LJUNG; VAHTER, 2007). De acordo com Perl e Olanow (2007), os níveis de Mn são controlados no intestino, porém quando há uma sobrecarga de Mn nesse sistema pode haver um desequilíbrio na homeostase.

Nesse sentido, foi observado que o mecanismo de distribuição do manganês se assemelha ao do ferro, e ocorrem de maneira competitiva (RIVERA-MANCÍA; RÍOS; MONTES, 2011), e, quando absorvido no intestino, o Mn ligado à transferrina (Tf) e/ou albumina é transportado ao fígado, sendo que o Mn complexado à Tf está em seu estado de oxidação trivalente, ou seja, há dois íons metálicos fortemente ligados a cada molécula de Tf (FITSANAKIS *et al.*, 2010; RIVERAMANCÍA; RÍOS; MONTES, 2011).

Na literatura, sugere-se que devido ao fato de que receptores de transferrina (TfR) estarem presentes nos capilares cerebrais, o Mn complexado com Tf tem capacidade de se ligar a esses capilares e entrar nas células endoteliais, que segue para a superfície celular para ser liberado no fluido extracelular, no qual irá se ligar a neurônios que possuem TfR e transportadores de metal divalente (DMT 1) (MORRIS *et al.*, 1992; MOOS; MORGAN, 2002; FITSANAKIS *et al.*, 2010).

1.5 Alterações bioquímicas causadas pela exposição ao Manganês

Na literatura específica sobre exposições prolongadas ao Mn, é comum encontrar trabalhos que relatem o aparecimento do manganismo (explicado no próximo tópico), porém, são escassos os trabalhos que correlacionam a deposição do metal em tecidos hepáticos e renais à parâmetros bioquímicos.

Keen e colaboradores (1984) realizaram um trabalho em ratos que demonstrou que a concentração de Mn via intraperitoneal (I.P) aumentou em todos os tecidos estudados (fígado, rim, plasma e cérebro), nas doses de 2,5 mg, 10 mg e 40 mg, e foi observado a relação dose-resposta, dentro de 120 minutos. Na dose de

10 mg, houve um pico de aumento de glicose na primeira hora, e após 24 horas após a exposição, os níveis de Mn retornaram aos níveis basais no fígado.

Em outro trabalho, ratos machos da linhagem Wistar foram expostos a doses de 0,001, 0,01, 0,05 e 0,1 g/kg por via intragástrica e foram avaliados marcadores bioquímicos hepáticos aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, gamaglutamiltransferase, superóxido dismutase (AST, ALT, GGT, SOD). Nesse estudo, um grupo foi exposto a tetracloreto de carbono (CCl₄) afim de induzir hepatotoxicidade e, após isso, foi realizado o tratamento via intragástrica com Mn e foi observado que houve melhora no tecido após o tratamento, pois valores de AST, ALT, GGT e SOD reduziram, que sugere a possibilidade do Mn fornecer proteção contra induzida (EIDI *et al.*, 2013).

1.6 Efeitos da subdose e sobredose de Manganês

Apesar de haver poucos estudos, os dados presentes na literatura revelam que a deficiência de manganês pode provocar diversos problemas fisiológicos, podendo causar prejuízos na formação óssea de crianças em desenvolvimento provocando ataxia congênita irreversível, epilepsia, redução da fertilidade, alteração dos níveis de insulina podendo provocar aumento da glicose no organismo, alteração do metabolismo de lipídeos e carboidratos e prejuízo nas reações de oxidação no organismo. Tais achados foram observados em trabalhos experimentais em ratos, e ainda não foi comprovado clinicamente em seres humanos, e seus mecanismos ainda não estão bem estabelecidos na literatura (FREELAND-GRAVES; LIANES, 1994; KEEN *et al.*, 1999).

Em humanos, há um estudo que demonstrou que uma dieta empobrecida de Mn em humanos provocou erupções cutâneas eritematosas na região do pescoço (FRIEDMAN *et al.*, 1987). Penland e Johson em 1993 realizaram um estudo com uma população feminina expostas a 1 mg de Mn por dia, e foi observado alterações de humor durante o período de trinta dias e aumento de cólicas na fase pré-menstrual, porém, os mecanismos pelos quais isso acontece ainda não foram descritos.

O excesso de manganês é bem reportado na literatura, no qual o primeiro caso observado de toxicidade ao Mn aconteceu no ano de 1837 na França, onde foi

observado sinais clínicos de danos neurológicos em indivíduos que trabalhavam em garimpos de minérios (SANTAMARIA, 2007). Atualmente, os estudos relacionados a bioacúmulo de Mn na região do cérebro são bem reportados e é conhecido por causar danos motores equivalentes à Doença de Parkinson, denominado Manganismo (RACETTE *et al.*, 2001). O fato do mecanismo de ação do manganês se assemelhar ao do ferro, por conta da similaridade química entre esses dois elementos, o aumento de Mn biodisponível pode levar à anemia ferropriva (RIVERA-MANCÍA; RÍOS; MONTES, 2011). Mesmo com diversos estudos experimentais acerca dos efeitos causados pela exposição prolongada ao Mn, é escasso aqueles que relacionam gênero, dose e via de exposição.

1.7 Influência do gênero sobre efeitos do Manganês

Em relação à estudos que comparam a susceptibilidade de intoxicação por Mn em relação ao gênero, há um certo conflito de resultados; pois os estudos não observam a susceptibilidade ao Mn para nenhum sexo/gênero, pois em cada estudo teve suas particularidades e os resultados finais não se corroboram. No trabalho desenvolvido por Finley e colaboradores (1994) submeteram homens e mulheres a uma dieta balanceada com Mn a fim de avaliar a quantidade de ferritina (transportador em comum de Fe e Mn), e observaram que os homens possuem níveis menores de ferritina se comparado às mulheres, e por isso, a concentração de Mn no sangue era maior nos homens.

No ano 2000, a Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR) situada no Estado de Atlanta nos Estados Unidos, revelou um estudo com animais machos e fêmeas e observaram que as fêmeas absorveram maiores quantidades de Mn. Já em 2001, DIAZ e colaboradores conduziram um experimento no qual avaliou a quantidade de Mn sérico em homens e mulheres e não foi observado diferenças nos resultados, tampouco avaliado danos neurológicos.

O trabalho de Dorman e colaboradores (2004) submeteu ratos (machos e fêmeas) a inalação de sulfato de manganês e fosfato de manganês para avaliar a deposição em estruturas cerebrais, e foi observado que houve diferenças na deposição em relação ao gênero macho x fêmea.

Em 2007, Sahni e colaboradores observaram que as mulheres de uma família exposta sazonalmente ao Mn apresentaram sintomas clínicos que poderiam sugerir intoxicação por Mn. Por fim, um estudo realizado em 2014 avaliou os níveis de Mn no sangue de uma população com crianças, mulheres e homens de várias idades e foi observado que a média dos níveis sanguíneos de Mn foram maiores em mulheres se comparado aos homens, e em gestantes os níveis eram maiores (OULHOTE *et al.*, 2014).

2 JUSTIFICATIVA

Avaliar intoxicações ocupacionais, medicamentosas e alimentares causadas por metais é de grande valia, visto que podem acarretar em danos fisiológicos aos indivíduos. Porém há poucos trabalhos que demonstram o bioacúmulo do Mn em diferentes tecidos cerebrais, renais e hepáticos envolvendo estudos gênero-específicos.

Salienta-se ainda que, há vários trabalhos descritos na literatura sobre intoxicação crônica por Mn incluindo a sua distribuição e avaliação de possíveis mecanismos de ação; no entanto, grande parte desses trabalhos experimentais utilizaram somente ratos machos em seus experimentos, e, por isso, existe uma carência de estudos que avaliem ambos os gêneros sujeitos às mesmas condições.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Geral

Avaliar a influência de gênero e dose-dependência da exposição intraperitoneal (I.P) à Manganês em ratos da linhagem Wistar.

3.2 Objetivos Específicos

- Quantificar Mn e Fe em algumas regiões do SNC (Tronco Encefálico, Cerebelo, Hipocampo) e em órgãos excretadores (tecido hepático e renal) em ratos machos e fêmeas expostos a Mn 1 mg/Kg e 5 mg/Kg em relação aos grupos controles;
- Avaliar parâmetros bioquímicos de danos renal e hepático em ratos machos e fêmeas expostos a Mn 1 mg/Kg e 5 mg/Kg em relação aos grupos controles.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes

Os reagentes químicos foram adquiridos a partir das seguintes fontes: cloreto de manganês tetra-hidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) da Sigma-Aldrich® (St. Louis, Estados Unidos); solução de soro fisiológico 0,9% (NaCl 0,9%) da Aster® (Sorocaba, Brasil); ketamina® (Fort Dodge, IA); xilazina® (Vedco, São José, MO); triton X-100 e hidróxido de tetrametilamônio em água (TMAH) 25% (m/v) foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, EUA). Todos os reagentes foram de grau analítico, grau HPLC, ou o melhor grau farmacêutico disponível.

Todas as amostras foram armazenadas em tubos de propileno do tipo Falcon® livres de contaminação por metais (BD® - Becton, Dickinson and Company).

4.2. Animais e tratamento

Ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) foram adquiridos do Biotério do curso de Psicologia da Universidade Católica de Brasília, (UCB) (Taguatinga, DF, Brasil). Foram alojados em salas com estantes climatizadas, gaiolas coletivas com maravalha em um ciclo de 12h/12h de claro/escuro, luz com intensidade entre 250 e 500 lx a 76 centímetros do piso do ambiente, com temperatura controlada de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$. No período de tratamento, os ratos tinham 8 semanas de idade e pesavam entre 280-300 gramas e 180-220 gramas, machos e fêmeas, respectivamente.

Os animais tiveram acesso *ad libitum* a água da torneira filtrada e ração extrusada (Presence Nutrição Animal® – Indústria Brasileira). Os estudos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília (CEUA- UnB) conforme certificado em anexo -Protocolo/UnBDoC nº 33255/2015- (anexo I).

O delineamento experimental para a verificação de acúmulo de Mn nos tecidos foi de um tratamento subcrônico (CASARETT e DOULL, 2012), totalizando 30 dias ininterruptos de tratamento. Os animais foram divididos em 3 grupos (controle n = 16, Mn 1 mg/Kg n = 16 e Mn 5 mg/Kg n = 16) como mostram a tabela 1

abaixo, e posteriormente cada grupo foi dividido em machos e fêmeas, os quais foram submetidos às mesmas condições, porém em gaiolas coletivas separadas.

Tabela 1: Grupos dos animais utilizados no trabalho.

| Grupo | | Número de animais | Tempo de tratamento (dias) | Dose administrada |
|------------|---|-------------------|----------------------------|------------------------------|
| Controle | ♂ | 08 | 30 | NaCl 0,9% por dia/ I.P.* |
| | ♀ | 08 | | |
| Mn 1 mg/Kg | ♂ | 08 | 30 | 1 mg/Kg de Mn por dia/ I.P.* |
| | ♀ | 08 | | |
| Mn 5 mg/Kg | ♂ | 08 | 30 | 5 mg/Kg de Mn por dia/ I.P.* |
| | ♀ | 08 | | |

*Via intraperitoneal (I.P); (♂) machos; (♀) fêmeas

O grupo controle foi submetido à administração de solução salina estéril 0,9% (NaCl 0,9%), correspondente a 10% do peso corporal de cada animal. Os grupos testes, foram expostos ao cloreto de manganês ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) dissolvidos em solução salina estéril, sendo que os cálculos foram ajustados para que a dose administrada fosse puramente manganês, nas doses de 1 mg/Kg e 5 mg/Kg. Os tratamentos ocorreram uma vez por dia, 7 dias por semana, durante 30 dias, todos por via intraperitoneal (I.P). Na literatura, a dosagem de 10 mg/Kg é uma dose usual em machos, no qual demonstra aumento significativo no bioacúmulo de Mn em tecidos cerebrais, sendo esse trabalho reproduzido por Guimarães e Santos (2015) utilizando fêmeas. Dando continuidade à esse trabalho, foi escolhido doses experimentais de 1 mg/Kg e 5 mg/Kg para avaliar o bioacúmulo em tecidos e relacionar efeitos do Mn nessas doses.

Vinte e quatro horas após a última injeção, os ratos foram anestesiados com ketamina/xilazina via I.P (75:10 mg/kg, 1 mg/kg). Todo o sangue do animal foi coletado, sendo a causa da morte exsanguinação; e, posteriormente as amostras de rim e fígado foram coletadas usando pinças e acondicionadas em microtubos. Os cérebros dos ratos foram dissecados para coleta de: cerebelo, tronco encefálico e hipocampo. As amostras foram armazenadas a - 80 °C para análise posterior (O'NEAL *et al.* 2014).

4.3. Determinação de Mn e Fe, por ICP-MS

As determinações de manganês e ferro foram realizadas utilizando um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) modelo ELAN DRC II (Perkin Elmer®, Norwalk, CT, EUA) operando com argônio de alta pureza (99,999%, Praxair – White Martins, Brasil) que está instalado em sala limpa classe 1000 no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da FCFRP-USP. Todos os parâmetros instrumentais foram diariamente otimizados.

Antes das determinações, as amostras de tecidos biológicos tiveram sua matriz solubilizada com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) por 7 dias, em seguida foi adicionado o diluente Triton X-100 e ácido nítrico 0,2%. Os elementos determinados foram o Manganês (Mn⁵⁵) e o Ferro (Fe⁵⁷) e a leitura no ICP-MS foi realizada duas vezes.

4.4. Análises bioquímicas

A amostra utilizada foi o soro do sangue dos animais, centrifugado (3000 rpm) durante 5 minutos a 21 °C, e armazenado em freezer – 80 °C. Posteriormente, foram avaliadas as frações séricas de colesterol total, triglicerídeos, glicose, transaminase glutâmica oxalacética (TGO), transaminase glutâmica pirúvica (TGP), Uréia e Creatinina por método enzimático com kits específicos (Kovalent diagnosis, Kovalent do Brasil Ltda., Rio de Janeiro/RJ). As determinações bioquímicas foram realizadas em espectrofotômetro LAMBDA™ 35 Series UV/Vis da PerkinElmer® do laboratório de Análises Clínicas da Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

4.5. Estatística

Para a validação dos resultados obtidos por ICP-MS (concentração de metais nos tecidos) foi analisado material de referência certificado, e nas análises bioquímicas foram utilizados os padrões comerciais. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média e o teste estatístico aplicado foi o ANOVA duas vias com *pos hoc* Tukey, utilizando o programa GraphPad Prism® 6. Valores de

$p < 0,05$ foram considerados significativos, onde letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os grupos.

5. Resultados e discussão

Os dados foram expressos em subtópicos comparando a deposição de Mn e Fe nos dissecados de SNC, hepáticos e renais. Os tecidos de SNC analisados foram: cerebelo, tronco encefálico e hipocampo.

5.1 Deposição de Mn e Fe em dissecados de SNC

5.1.1 Deposição de Mn e Fe no hipocampo

Na figura 1 (A) abaixo é demonstrado graficamente a concentração de Mn no hipocampo. Nesse dissecado é possível observar que o bioacúmulo de Mn foi dose-dependente e com pouca influência do gênero, diferença estatística relacionada ao gênero ocorreu apenas com a dose de 1 mg/Kg ($p < 0,05$). Em relação à concentração de Fe no mesmo tecido, os níveis foram aumentados nos grupos expostos ao Mn (grupo Mn 1 mg/Kg e Mn 5 mg/Kg), não tendo influência de gênero nem dose-dependência (Figura 1 B). Esses dados mostram que mesmo com o aumento de Mn nos grupos expostos, não houve redução de Fe, fato esse que não era esperado, pois de acordo com a literatura quando há o aumento de Mn em uma determinada região do cérebro, tende-se à redução de Fe pois são metais que competem pelos mesmos transportadores endógenos.

Figura 1: Concentração de Mn e Fe no hipocampo dos grupos estudados.

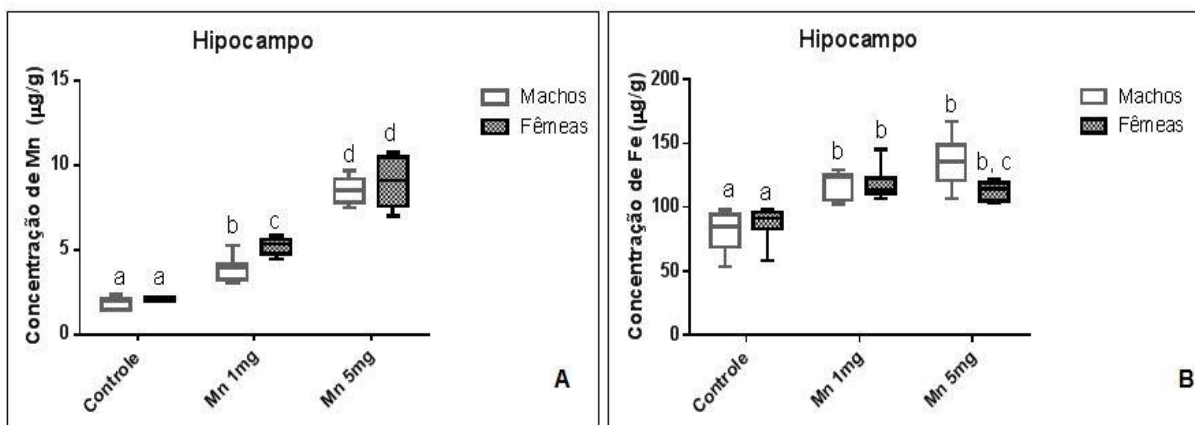


Figura 1: (A) Concentração de Mn no hipocampo grupo controle, Mn 1 mg/Kg e Mn 5 mg/Kg (machos e fêmeas). **(B)** Concentração de Fe no hipocampo do grupo controle, Mn 1 mg/Kg e Mn 5 mg/Kg (machos e fêmeas). Valores médios com a mesma letra não diferem estatisticamente. $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Em 2011, Bouchard e colaboradores realizaram um trabalho no qual foi observado que o hipocampo estava entre as regiões do cérebro com maior bioacúmulo de Mn, após expor animais a esse metal, e sugeriram que o excesso de Mn nesse dissecado poderia apresentar déficits relacionados a memória e aprendizagem. Em 2015, Su e colaboradores realizaram um estudo nesse mesmo sentido, onde ratos foram expostos à sulfato de manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) nas doses de 5 mg/Kg, 10 mg/Kg e 20 mg/Kg via intraperitoneal durante 24 semanas consecutivas e foi observado que houve diminuição dose-dependente na capacidade de aprendizagem e memória nos grupos tratados, além de alterações morfológicas, degeneração e morte celular no tecido em estudo, fato esse que corrobora com os dados obtidos nesse presente trabalho.

Santana (2015) realizou experimentos comportamentais nos mesmos animais tratados deste trabalho e foi observado que no grupo 1 mg/Kg macho houve um efeito pró-depressivo devido ao aumento do tempo de imobilidade no teste comportamental de nado forçado, indicando uma possível participação da noradrenalina nessa resposta. Em 2015, Pang e colaboradores realizaram um estudo no qual expuseram ratos a Mn via I.P. por 16 semanas em três doses diferentes, e observaram que houve perda de neurônios dopaminérgicos, fato esse que corrobora com o trabalho citado acima, pois a noradrenalina é produto da conversão da dopamina, e quando há a falta de substrato para a conversão de uma monoamina em outra, tende-se a haver um desbalanço entre estes neurotransmissores e a gerar o efeito pró-depressivo (Goodman e Gilman, 2010). Ainda sobre a modulação de neurônios dopaminérgicos, o trabalho de Santana (2015) observou variações da atividade exploratória, no qual seus resultados foram dose-dependentes, obtendo hipoatividade com a maior dose em ambos os gêneros.

No trabalho de Diederich e colaboradores (2012), foi investigado a formação e distribuição de Mn e Fe em ratos *Sprague-Dawley* após uma única dose intravenosa (I.V.) de 1,5 mg/Kg de Mn. Após uma hora da injeção, foi observado que no sangue dos animais havia maior quantidade de Mn e transferrina, sugerindo que esse transportador estaria ligado ao Mn; e após quatro dias foi realizada a dosagem de

Mn no soro e não foi identificado a presença do metal na circulação sanguínea, sugerindo que esse já estivesse sido excretado, o que pode explicar a deposição de Mn no Sistema Nervoso Central (SNC).

5.1.2 Deposição de Mn e Fe no cerebelo e tronco encefálico

As figuras 2 (A) e 3 (A) abaixo demonstra graficamente a concentração de Mn no cerebelo e no tronco encefálico, respectivamente. É possível observar que, em ambos os dissecados, o bioacúmulo de Mn foi dose-dependente apenas para o grupo das fêmeas ($p < 0,05$). Em relação aos machos, é possível observar o maior bioacúmulo de Mn no grupo exposto à 1 mg/Kg de Mn I.P., sendo que para a dose de 5 mg/Kg não houve aumento no bioacúmulo de Mn no cerebelo e no tronco encefálico o bioacúmulo foi menor do que na dose de 1 mg/Kg.

Figura 2: Concentração de Mn e Fe no cerebelo dos grupos estudados.

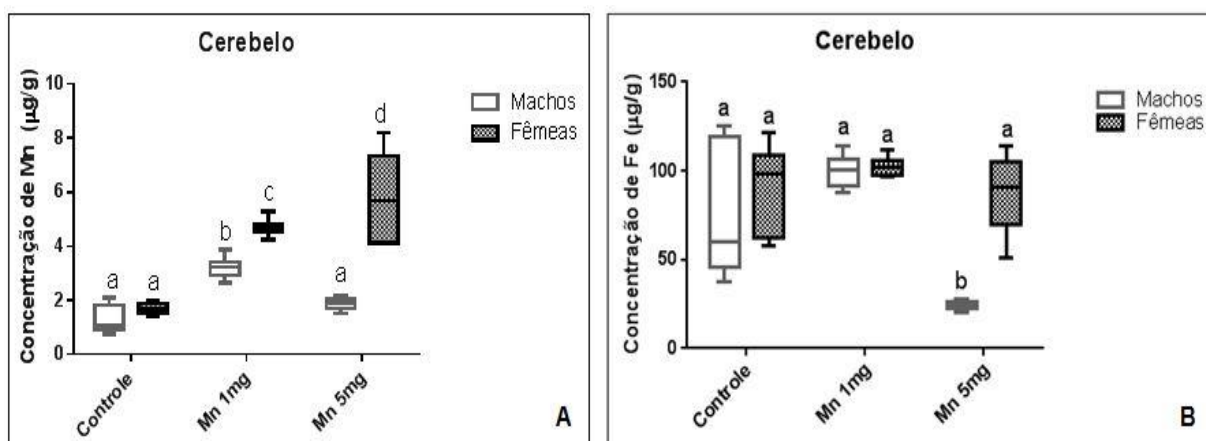


Figura 2: (A) Concentração de Mn no cerebelo do grupo controle, Mn 1 mg/Kg e Mn 5 mg/Kg (machos e fêmeas). **(B)** Concentração de Fe no cerebelo do grupo controle, Mn 1 mg/Kg e Mn 5 mg/Kg (machos e fêmeas). Valores médios com a mesma letra não diferem estatisticamente. $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Figura 3: Concentração de Mn e Fe no tronco encefálico dos grupos estudados.

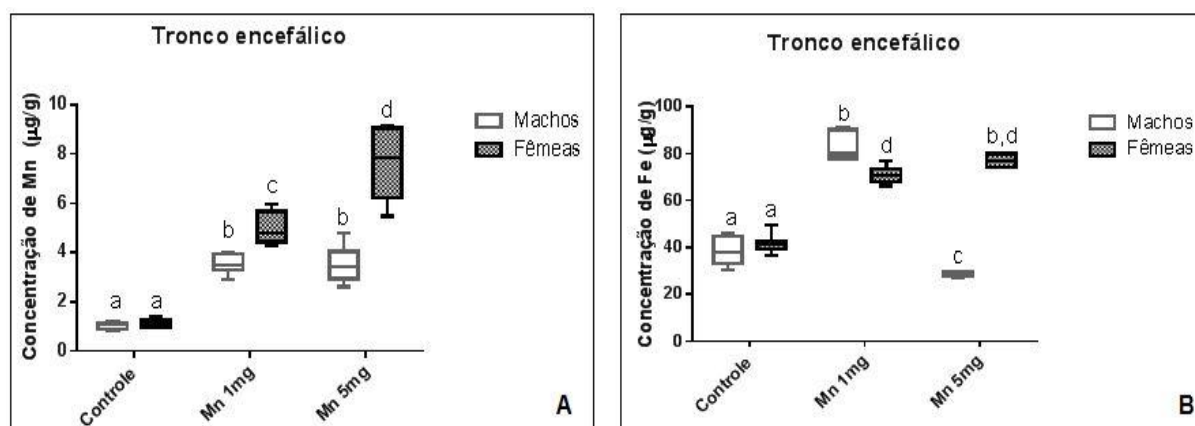


Figura 3: (A) Concentração de Mn no tronco encefálico do grupo controle, Mn 1 mg/Kg e Mn 5 mg/Kg (machos e fêmeas). **(B)** Concentração de Fe no tronco encefálico do grupo controle, Mn 1 mg/Kg e Mn 5 mg/Kg (machos e fêmeas). Valores médios com a mesma letra não diferem estatisticamente. $p < 0,05$ foi considerado significativo.

No presente estudo, foi possível observar a forte dependência de gênero na deposição de Mn no cerebelo e tronco encefálico em fêmeas até a dose de 5 mg/Kg de Mn. De acordo com a literatura, o tronco encefálico está relacionado com a produção de monoaminas, e o excesso de metais (Mn e Fe) pode desencadear danos oxidativos que podem desequilibrar a produção de monoaminas, causando danos psiquiátricos. Corroborando com esse achado, Goodman e Gilman (2010) ainda afirmam que os principais neurônios cerebrais que contêm monoaminas estão localizados nesse sistema, que inter-relacionados estímulos sensoriais e motores periféricos, e por isso danos nessa região trazem tantos prejuízos. Já o cerebelo, tem forte influência nas funções viscerais e tem papel significativo na aprendizagem e na memória.

Na literatura, há trabalhos que demonstram os efeitos do Mn em diversas doses e variadas vias de administração.

Ao considerarmos a via de exposição endovenosa, os efeitos causados pela administração de $MnCl_2$ na dose única de 1,5 mg/Kg, via que também é de alta biodisponibilidade assim como na via de administração intraperitoneal, foi observado que há uma deposição de cerca de 19% do total do metal administrado no cérebro, corroborando com os dados obtidos neste trabalho. Porém, no trabalho usando via intravenosa (I.V.) não foi observado prejuízos comportamentais, contrastando com

os dados observados pelo nosso grupo (GALLEZ *et al.*, 1998; PAN *et al.*, 2010; DIEDERICH *et al.*, 2012; NETH *et al.*, 2015).

Por outro lado, considerando a mesma via de administração deste trabalho, Santos e colaboradores (2012) e Dinamene e colaboradores (2013), compararam a concentração de Mn no córtex e foram avaliadas reações comportamentais em ratos machos da linhagem *wistar* expostos via I.P. ao $MnCl_2$ na concentração de 25 mg/Kg em dias alternados, em oito doses, e salina (NaCl 0,9%) no grupo controle. Os animais foram eutanasiados no dia 1, 10, 30 e 70 após a última dose, e foi observado que a concentração no córtex foi muito grande no dia 1 após a última dose, decrescendo esse bioacúmulo nos dias 10, 30 e 70. Observou-se também que os animais expostos ao Mn cruzaram com menos frequência o teste de campo aberto, o que indica maior imobilidade devido ao tratamento. Diante disso, foi possível observar que apesar da concentração nos tecidos decrescer entre o dia 1 e 70 após a última exposição ao metal, as alterações comportamentais persistiram e as reações de oxidação no tecido cerebral continuaram ocorrendo. Esse trabalho mostrou que apesar da deposição diminuir após cessar a exposição do Mn, os efeitos neurotóxicos desencadeados persistem.

Com relação à via oral de administração, em 2000 Dorman e colaboradores realizaram um experimento com ratos adultos e neonatos e observou que a administração de $MnCl_2$ em concentrações de 25 mg/Kg e 50 mg/Kg via oral em 21 dias consecutivos aumentou o bioacúmulo nos dissecados cerebrais. Mesmo que as vias de administração entre os estudos sejam diferentes, os efeitos causados pelo excesso de Mn foram semelhantes, pois os dados de bioacúmulo obtidos nesse trabalho corroboram com os de cerebelo e tronco encefálico em fêmeas, e no hipocampo em machos e fêmeas.

Para avaliar a interferência do Mn na absorção de ferro, Rossander-Hultém e colaboradores (1991) realizou um trabalho onde os voluntários ingeriram (via oral) sulfato ferroso com e sem manganês a fim de observar se houve redução da absorção de ferro. O estudo mostrou que houve redução na absorção do ferro nos indivíduos que fizeram uso de manganês adicionado ao sulfato ferroso, onde a ingestão de Mn em 7,5 mg e 15 mg reduziu a absorção de 3 mg de ferro – proporção de 21% e 34%, respectivamente). Outro experimento foi realizado nessa pesquisa,

onde os voluntários ingeriram hambúrguer enriquecido com manganês e ferro, e foi observado que a absorção de ferro diminuiu 40%.

O esperado nesse estudo era que o Mn aumentado fizesse com que concentrações de Fe diminuíssem, pois no trabalho de Fitsanakis e colaboradores (2010) e o de Rossander-Hultém e colaboradores (1991) citado acima, essa relação foi observada devido à similaridade química entre eles; porém, isso não ocorreu, nem no cerebelo, nem no tronco encefálico. Portanto, é importante hipotetizar que o excesso de metais em dissecados cerebrais (não somente o Mn) podem estar relacionados com danos neurológicos, ou que essa interdependência de Mn e Fe esteja relacionado quando a via de exposição ao Mn seja via oral, o que não cabe ao nosso trabalho pois o nosso estudo foi realizado por via intraperitoneal.

5.2 Deposição de Mn e Fe em tecidos renais

Em relação ao bioacúmulo de Mn nos rins, houve diferença significativa apenas nos grupos 5 mg/Kg sem influência dos gêneros ($p < 0,05$) (Figura 4 A), corroborando com os achados de Guimarães (2015), utilizando a dose de 10 mg/Kg em fêmeas em que foi possível observar também esse aumento de Mn nos rins.

No que tange ao ferro, houve uma diminuição do bioacúmulo deste metal nos ratos expostos ao Mn nas duas doses, sem influência do gênero, corroborando com a hipótese de Fitsanakis e colaboradores (2010).

Figura 4: Concentração de Mn e Fe no rim dos grupos estudados.

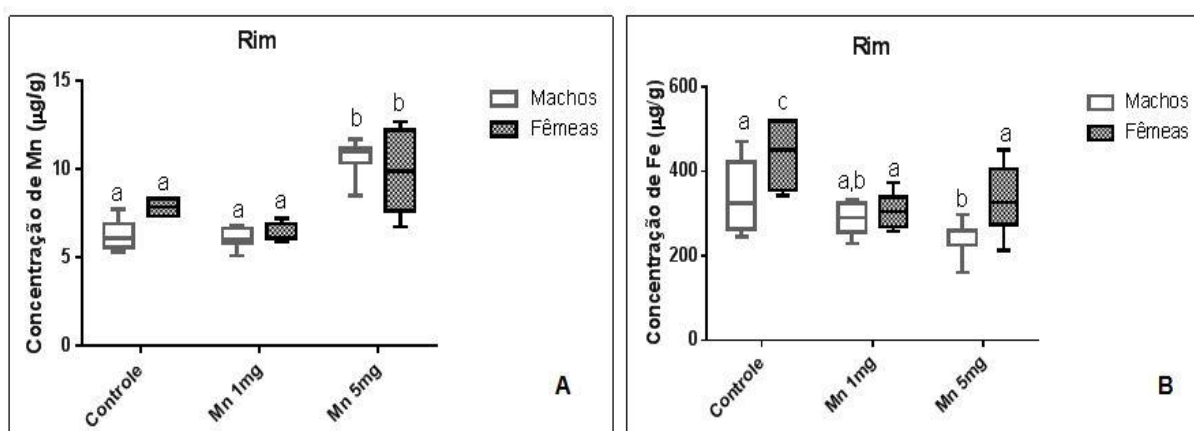


Figura 4: (A) Concentração de Mn no rim do grupo controle, Mn 1 mg/Kg e Mn 5 mg/Kg(machos e fêmeas). **(B)** Concentração de Fe no rim do grupo controle, Mn 1

mg/Kg e Mn 5 mg/Kg (machos e fêmeas). Valores médios com a mesma letra não diferem estatisticamente. $p < 0,05$ foi considerado significativo.

A literatura relata que a possível via de excreção do metal seja por via hepatobiliar (GALLEZ *et al.*, 1998; PAN *et al.*, 2010; NETH *et al.*, 2015). No trabalho de Diederich e colaboradores (2012) citado acima, no qual ele observou que houve aumento de transferrina após administração de Mn em ratos e passado alguns dias observou que não havia mais o metal na circulação sanguínea, sugerindo que o metal já tivesse sido excretado. Porém, foi identificado um aumento significativo de Mn inorgânico no cérebro e nos rins, sugerindo que os rins também desempenham papel regulador na homeostase de Mn. O fato da eutanásia ter ocorrido após 24 horas após a última dose, e a exposição ter sido subcrônica, acredita-se que os rins já estivessem desempenhando papel regulador de Mn, e por isso houve o bioacúmulo nos grupos Mn 5 mg/Kg (machos e fêmeas).

5.3 Deposição de Mn e Fe nos tecidos hepáticos

Na figura 5 abaixo está a demonstração gráfica da média de concentração de Mn e Fe dos fígados dos animais estudados. Na imagem 5 (A) é possível observar que houve diferenças no bioacúmulo entre as doses administradas (grupo controle e grupos expostos a Mn), porém não houve diferença entre os gêneros. Para o elemento Ferro, como era de se esperar, a concentração no tecido hepático de fêmeas controle é maior que em machos, isso porque a fisiologia feminina requer maior aporte de Fe devido aos eventos hormonais (Figura 5 B). E é possível observar ainda que a concentração de Fe diminuiu com a exposição ao Mn tanto nos grupos machos quanto nos grupos de fêmeas.

Figura 5: Concentração de Mn e Fe no fígado dos grupos estudados.

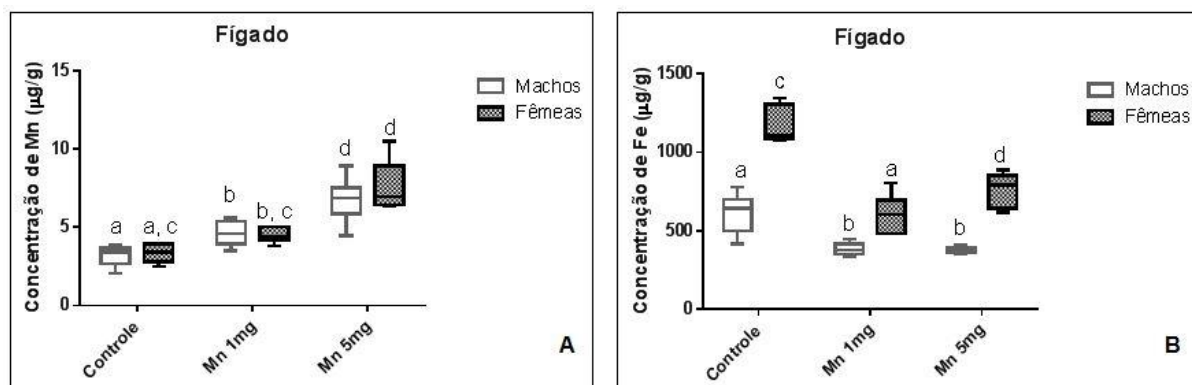


Figura 5: (A) Concentração de Mn no fígado do grupo controle, Mn 1 mg/Kg e Mn 5 mg/Kg (machos e fêmeas). **(B)** Concentração de Fe no fígado do grupo controle, Mn 1 mg/Kg e Mn 5 mg/Kg (machos e fêmeas). Valores médios com a mesma letra não diferem estatisticamente. $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Devido a concentração de Mn ter sido menor nos grupos controle, os níveis de Fe estão aumentados quando comparados aos grupos tratados, mostrando que não houve competição pelos transportadores. Alguns estudos mostram que os transportadores DMT1 estão presentes na parede da vasculatura (BURDO *et al.*, 2001, 2004; WU *et al.*, 2004), juntamente com receptores de transferrina e ferroportina, que estão localizados em diversos órgãos e também no fígado (YOU; WANG, 2005; YAMANISHI *et al.*, 2007; WARD, 2010). Erikson e colaboradores (2004) relatam que a expressão de DMT1 é regulada a partir do Fe disponível no organismo, e quando há aumento de Mn ou outros metais divalentes.

5.4 Análise bioquímica do soro

Nesse tópico será demonstrado os resultados obtidos das análises de soro dos animais envolvidos nesse trabalho, dos quais foram separados em três subtópicos, sendo eles: 1) Glicose, colesterol e triglicerídeos; 2) Uréia e creatinina; 3) TGO e TGP.

5.4.1. Glicose, colesterol e triglicerídeos

Como mostra as figuras 6 e 7 abaixo, para a glicemia e o colesterol não houve diferença estatisticamente relevante entre os grupos controles e expostos ao Mn ($p < 0,05$), sugerindo que, nas condições experimentais deste trabalho, o tratamento com Mn não altera o metabolismo da glicose nem do colesterol.

Figura 6: Concentração de glicose dos grupos estudados.

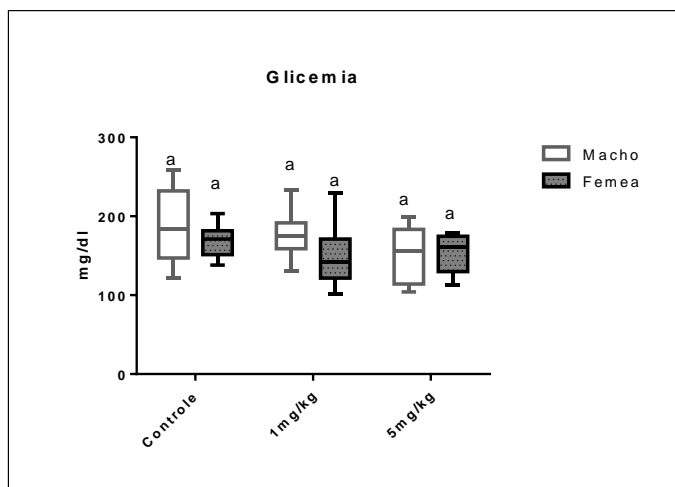


Figura 6: Concentração de glicose do grupo controle, Mn 1 mg/Kg e Mn 5 mg/Kg (machos e fêmeas) em mg/dL.

Sobre a relação de exposição ao Mn e análises bioquímicas, na literatura há um trabalho no qual é mostrado que a administração de uma dose única de Mn via I.P aumentou a glicemia de ratos na primeira hora após a injeção, e após esse tempo a glicemia voltou ao seu nível basal (KEEN *et al.*, 1984). Porém, apesar desse estudo ter utilizado a mesma via de administração que o presente trabalho, foi administrado apenas uma dose elevada, não servindo de padrão de comparação aos dados obtidos nesse estudo.

Nos anos 80, foi realizado um experimento avaliando a influência do Mn na dieta de aves em três doses distintas e em grupos variados de idade, no qual foi observado que não houve diferença significativa na alteração do metabolismo lipídico em nenhuma das doses e dos grupos experimentais (KLIMIS-TAVANTIZIS; KRIS-ETHERTON; LEACH., 1983), o que corrobora com os resultados obtidos nesse estudo.

Figura 7: Concentração de colesterol dos grupos estudados.

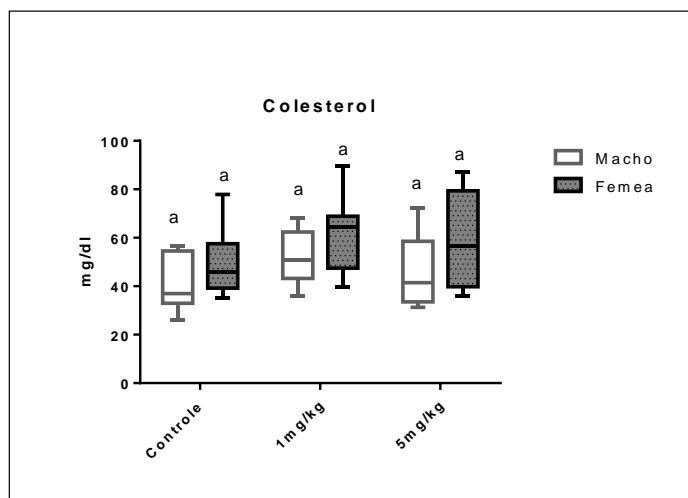


Figura 7: Concentração de colesterol do grupo controle, Mn 1 mg/Kg e Mn 5 mg/Kg (machos e fêmeas) em mg/dL.

Sobre os efeitos metabólicos da exposição I.P. de Mn em relação aos triglicerídeos, obtivemos dados muito interessantes, visto que houve o aumento de triglicerídeos nos grupos machos tratados com Mn e a redução no grupo das fêmeas tratadas com o mesmo metal, com $p < 0,05$ entre os grupos (Figura 8). Tendo em vista esse resultado, é notável que o Mn provoca diferenças metabólicas sobre os triglicerídeos e essas ocorrem dependendo do gênero. No entanto, não há nada na literatura que reporte esse tipo de efeito e por isso, mais pesquisas acerca do tema devem ser realizadas para esclarecer tal fato.

Figura 8: Concentração de triglicerídeos dos grupos estudados.

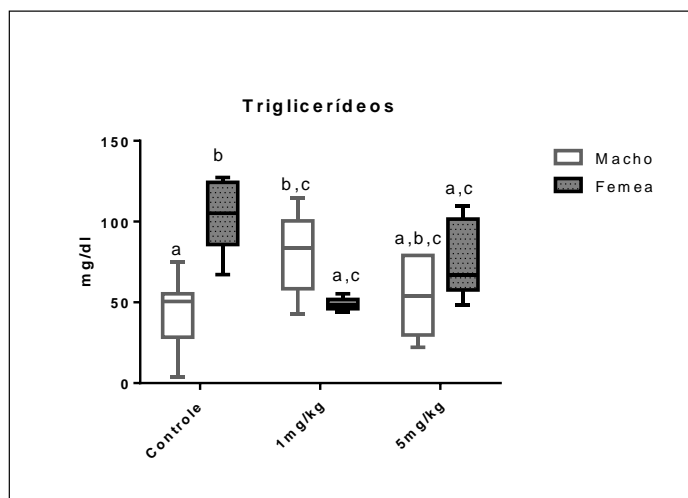


Figura 8: Concentração de triglicerídeos do grupo controle, Mn 1 mg/Kg e Mn 5 mg/Kg (machos e fêmeas) em mg/dL.

5.4.2. Uréia e creatinina

De acordo com a Sociedade Brasileira de Nefrologia, a relação entre a uréia e a creatinina sanguínea pode ser útil particularmente quando se deseja avaliar a taxa de filtração glomerular, ou seja, se há danos renais. Como foi demonstrado na figura 4 (A) deste trabalho, houve maior bioacúmulo de Mn nos rins dos grupos expostos a esse elemento (grupos machos e fêmeas expostos a Mn 5 mg/Kg), e portanto, resolveu-se investigar se houve dano renal pela deposição de Mn nesse órgão.

Na figura 9 (A e B) abaixo, observa-se que apesar de haver diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle fêmea e Mn 1 mg/Kg ($p < 0,05$); não é possível afirmar que houve dano renal, pois não houve aumento de uréia e creatinina nos grupos tratados, bem como é possível observar que não houve diferença de gênero na dosagem desses marcadores bioquímicos.

Figura 9: Concentração de uréia e creatinina dos grupos estudados.

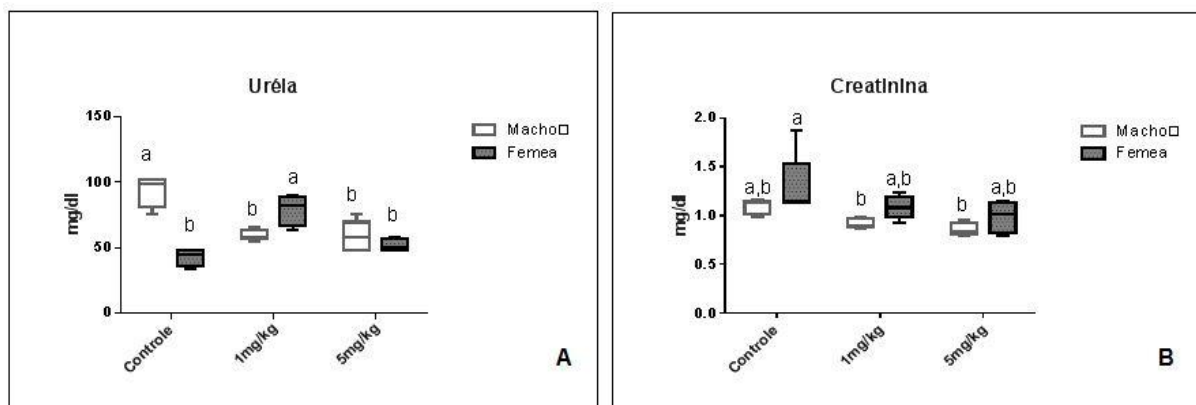


Figura 9: (A) Concentração de uréia do grupo controle, Mn 1 mg/Kg e Mn 5 mgKg (machos e fêmeas) em mg/dL. **(B)** Concentração de creatinina do grupo controle, Mn 1 mg/Kg e Mn 5 mg/Kg (machos e fêmeas) em mg/dL.

Portanto, diante das análises dos marcadores renais (uréia e creatinina) foi possível observar que a exposição ao Mn de forma subcrônica não alterou a função renal dos animais, indicando que mesmo com a deposição do metal no órgão, não há alteração de suas funções.

5.4.3. TGO e TGP

Em relação aos marcadores séricos hepáticos TGO (transaminase glutâmico-oxalacética) e TGP (transaminase glutâmico-pirúvica), a Sociedade Brasileira de Hepatologia descreve que o aumento de níveis séricos desses biomarcadores pode indicar inflamação no fígado.

No gráfico de TGO (Figura 10 (A)), houve apenas aumento do biomarcador no grupo das fêmeas expostas ao Mn na dose de 5 mg/Kg em comparação ao seu grupo controle, podendo indicar que houve algum dano, porém, as evidências não são suficientes para indicar que esse aumento de Mn realmente causou algum dano no fígado desses animais pois o TGO não é um marcador específico de dano hepático, podendo estar presente em diversas outras estruturas do organismo. Caso houvesse aumento dos biomarcadores TGO e TGP concomitantemente e esses

dados se correlacionassem, seria provável que o Mn realmente provocou danos hepáticos, porém isso não ocorreu nesse estudo.

Na figura 10 (B) abaixo, é possível observar que não houve diferenças significativas que indicassem que a exposição ao Mn causou algum dano no fígado, pois em relação ao grupo controle os valores de $p < 0,05$. Portanto, pode-se concluir que mesmo com a deposição de Mn nos grupos expostos na dose de 5 mg/Kg (Figura 5 (A)), não houve relação de gênero e dose para dano hepático.

Figura 10: Concentração de TGO e TGP dos grupos estudados.

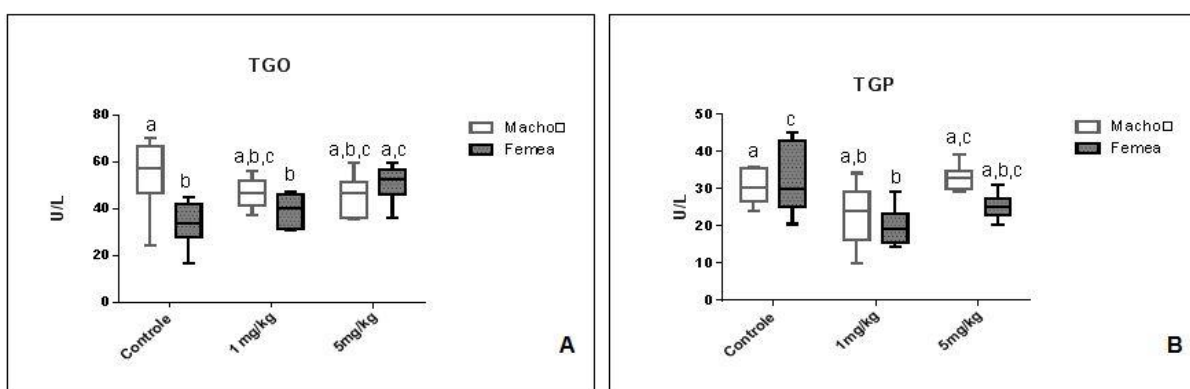


Figura 10: (A) Concentração de TGO do grupo controle, Mn 1 mg/Kg e Mn 5 mg/Kg (machos e fêmeas) em U/L. **(B)** Concentração de TGP do grupo controle, Mn 1 mg/Kg e Mn 5 mg/Kg (machos e fêmeas) em U/L.

6 Considerações finais

É indiscutível que o estudo da influência do Manganês (Mn) em gênero e dose é de grande valia para o entendimento da toxicologia deste elemento químico, pois na literatura preexistente são raros aqueles que comparam esses fatores e associam com análises bioquímicas a fim de obter hipóteses sobre a importância dos excessos de metais no organismo. O presente estudo mostrou que mesmo em doses menores, há bioacúmulo tanto de Mn quanto de Ferro (Fe) em algumas regiões de sistema nervoso central, sendo que no hipocampo o bioacúmulo de Mn foi dose-dependente com pouca influência de gênero, com aumento de Fe nos grupos tratados; no cerebelo e no tronco encefálico, o bioacúmulo de Mn foi dose-dependente apenas para as fêmeas e houve excesso de Fe em todos os grupos exceto no grupo machos de 5 mg/Kg de Mn. Diante desses resultados, sugere-se que haja diferentes formas de transporte desses metais divalentes até os órgãos alvo, o que pode estar associado a danos comportamentais. Em relação aos tecidos renais, houve aumento de Mn nos grupos 5 mg/Kg em ambos os gêneros e redução de Fe; e nos tecidos hepáticos houve dose-dependência sem influência de gênero, com diminuição de Fe nos grupos tratados, no entanto, não é possível dizer que houve dano em tecidos renais e hepáticos pois não foram evidentes as alterações dos biomarcadores bioquímicos; assim como foi possível observar que não houve alteração do metabolismo da glicose e do colesterol, porém, houve diferença de gênero no aumento de triglicerídeos em machos.

Portanto, é necessário que haja mais pesquisas acerca do tema que englobem estudos bioquímicos, toxicológicos e comportamentais no intuito de esclarecer os mecanismos de ação dos metais no organismo e suas influências no metabolismo.

7 Referências bibliográficas

ABRAMS, E *et al.* Absorption as a factor in manganese homeostasis. **Journal of Animal Science**, v. 42, n.3, p. 630-636, 1976.

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for manganese (update) Atlanta, GA: **Agency for Toxic Substances and Disease Registry**. 2000.

ARCHIBALD, F.S., TYREE, C. Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. **Arquives of Biochemistry and Biophysics**, v. 256, p. 638-650, 1987.

ASCHNER, J.L., ASCHNER, M. Nutritional aspects of manganese homeostasis. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 26, p. 353-362, 2005.

ASCHNER, M *et al.* Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 221, p. 131-147, 2007.

BARCELOUX, D.G. Manganese. **Clin Toxicol.** v. 37(2), p. 293–307, 1999.

BIRD, E.D.; ANTON, A.H.; BULLOCK, B. The effects of manganese inhalation on basal ganglia dopamine concentrations in rhesus monkey. **Neurotoxicology**, v. 5, p. 59-65, 1984.

BOUCHARD, M.F. *et al.* Intellectual impairment in school-age children exposed to manganese from drinking water. **Environmental Health Perspectives**, v. 1, p.138–143, 2011.

BOWLER, R.M. *et al.* Neuropsychological sequelae of exposure to welding fumes in a group of occupationally exposed men. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 206, n.6, p.517–529, 2003

BRADHAM, K.; WENTSEL, R. Scientific issues in the U.S. EPA framework for metals risk assessment. **Journal of Toxicology and Environmental Health**. v. 73, n. 2-3, p. 108-113, 2010.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº 269, de 22 de setembro de 2005. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. 2005.

BURDO, J.R. *et al.* Distribution of divalent metal transporter 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat. **The Journal of Neuroscience**, v. 66, p. 1198- 1207, 2001.

BURDO, J.R. *et al.* Regulation of the profile of iron-management proteins in brain microvasculature. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 24, p. 67-74, 2004

CAUSSY, D. *et al.* Lessons from case studies of metals: investigating exposure, bioavailability and risks. In: **Ecotoxicol. Environ.** v. 56, p. 32-44, 2003.

CASARETT e DOULL. **Fundamentos em Toxicologia**. 2.ed, Artmed, 2012.

DIAZ, C. *et al.* Serum manganese concentrations in a representative sample of the Canarian population. **Biology Trace Elements Research**, v. 80, p. 43-51, 2001.

DIEDERICH, J. *et al.* Manganese and iron species in Sprague-Dawley rats exposed with MnCl₂ center dot 4H(2)O (i.v.). **Microchemical Journal**. v. 105, p.115–23, 2012;

DINAMENE, S. *et al.* Evaluation of neurobehavioral and neuroinflammatory endpoints in the post-exposure period in rats sub-acutely exposed to manganese. **Toxicology**. v. 314, p. 95– 99, 2013.

DOBSON, A.W. *et al.* Manganese neurotoxicity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1012, p. 115-128, 2004.

DORMAN, D.C. *et al.* Old age and gender influence in pharmacokinetics of inhaled manganese sulfate and manganese phosphate in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 197, p. 113-124, 2004.

EIDI, A. *et al.* Hepatoprotective Effect of Manganese Chloride Against CCl₄-Induced Liver Injury in Rats. **Biol Trace Elem Res.** v.155, p. 267–275, 2013.

EPA. **Health effects support document for manganese.** U.S. Environmental Protection Agency; 2003.

ERIKSON, K.M., *et al.* Manganese neurotoxicity: a focus on the neonate. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 113, p. 369-377, 2007.

FINLEY, J.W., JOHNSON, P.E., JOHNSON, L.K. Sex affects manganese absorption and retention by humans from diet adequate in manganese. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 60, p. 949-955, 1994

FITSANAKIS, V.A. *et al.* Manganese (Mn) and Iron (Fe): interdependency of transport and regulation. **Neurotoxicity Research**. v. 18, p. 124-131, 2010.

FREELAND-GRAVES, J.H., LLANES, C. Models to study manganese deficiency, in Manganese in Health and Disease. **Klimis-Tavantzis, D.J.**, ed., CRC Press, Boca Raton, p.59-86, 1994.

FRIEDMAN, B.J. *et al.* Manganese balance and clinical observations in young men fed a manganese-deficient diet. **Journal. Nutr.** v. 117 (1), 133-143, 1987.

GALLEZ, B., BAUDELET, C., GEURTS, M. Regional distribution of manganese found in the brain after injection of a single dose of manganese-based contrast agents. **Magnetic Resonance Imaging**. v. 16 (10), p. 1211–5, 1998.

GERBER, G.B., LEONARD, A., HANTSON, P.H. Carcinogenicity, mutagenicity and mutagenicity of manganese compounds. **Crit. Rev. in Oncol./Hematol.** v. 42, p. 25-34, 2002.

GOODMAN e GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica. 11 ed. Porto Alegre, **AMGH**. 2010.

GREGER, J.L. Nutrition versus toxicology of manganese in humans: evaluation of potential biomarkers. **Neurotoxicol.**, v. 20, p. 205-12, 1999.

GUIMARÃES, I.M.S.R.G. **Efeito do gênero sobre a distribuição tecidual de manganês em ratos tratados com dose neurotóxica desse metal**. 2015. 29f. Monografia. Faculdade de Ceilândia – Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

GUNTER, T.E. *et al.* Speciation of manganese in cells and mitochondria: A search for the proximal cause of manganese neurotoxicity. **Neurotoxicity**, v. 27, p. 767-776, 2006.

HARDY, I.J., GILLANDERS, L., HARDY, G. Is manganese an essential supplement for PN? **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**. v. 11, p. 289-296, 2008.

LJUNG, K., VAHTER, M. Time to re-evaluate the guideline value for manganese in drinking water? **Environmental Health Perspectives**. v. 115, p. 1533-1538, 2007.

KEEN, C.L. *et al.* Nutritional aspects of manganese from experimental studies. **Neurotoxicology**. v. 20(2- 3), p. 213-223, 1999.

KEEN, C.L., BALY, D.L., HURLEY, L.S. Manganese deficiency and toxicity: Effects on carbohydrate metabolism in the rat. **Neurotoxicology**. v. 5, p. 97–104, 1984.

KLIMIS-TAVANTIZIS, D.J., KRIS-ETHERTON, P.M., LEACH, R.M. The Effect of Dietary Manganese Deficiency on Cholesterol and Lipid Metabolism in the EstrogenTreated Chicken and the Laying Hen. **J Nutr**. v. 113(2), p. 320-7, 1983.

KRISHNA, S. *et al.* Brain deposition and neurotoxicity of manganese in adult mice exposed via the drinking water. **Archives of Toxicology**. v. 88, p.47–64, 2013.

LAOHAUDOMCHOK, W. *et al.* Neuropsychological effects of low-level manganese exposure in welders. **NeuroToxicology**, v. 32, p.171-179, 2011.

LIU, X. *et al.* Manganese-induced neurotoxicity: the role of astroglial-derived nitric oxide in striatal interneuron degeneration. **Toxicological Sciences**, v. 91, p. 521-531, 2006.

MORRIS, C.M. *et al.* Uptake and distribution of iron and transferrin in the adult brain. **Journal of Neurochemistry**. v. 59, p. 300-306, 1992.

MOOS, T., MORGAN, E.H. A morphological study of the developmentally regulated transport of iron into the brain. **Developmental Neuroscience**. v. 24, p. 99-105, 2002.

MUSTAFA, S.J., CHANDRA, S.V. Levels of 5-hydroxytryptamine, dopamine and norepinephrine in whole brain of rabbits in chronic manganese toxicity. **Journal of Neurochemistry**, v. 18, p. 931 – 933, 1971.

NETH, K. *et al.* Changes in Brain metallome/Metabolome pattern due to a single i.v. injection of manganese in rats. **PLoS One**. v. 10 (9), 2015.

NORDBERG, G.F. *et al.* **Handbook on the toxicology of metals**. 3ed. Burlington: Academic Press, p. 975, 2007.

NRC. National Research Council. Food and Nutrition Board. 10th ed. Washington, DC: National Academy Press; **Recommended dietary allowances**. p. 230-235, 1989.

OGA, S., CAMARGO, M.M.A., BATISTUZZO, J.A.O. Fundamentos de Toxicologia. 3° Ed. São Paulo, **Atheneu**, 2008.

O'NEAL, S. L. *et al.* Subacute manganese exposure in rats is a neurochemical model of early manganese toxicity. **NeuroToxicology**. v. 44, p. 303-313, 2014.

PAN, D., *et al.* Revisiting an old friend: manganese-based MRI contrast agents. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.** v.10, 2010.

PANG, L., *et al.* A study of divalent metal transporter 1 and ferroportin 1 in brain of rats with manganese-induced parkinsonism. **Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi.** v. 33(4), p. 250-4, 2015.

PENLAND, J.G., JOHNSON, P.E. Dietary calcium and manganese effects on menstrual cycle symptoms. **Am. J. Obstet. Gynecol.**v. 168(5), p. 1417-1423, 1993.

PERL, D.P.; OLANOW, C.W. The neuropathology of manganese-induced Parkinsonism. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology.** v. 66, p. 675-682, 2007.

RACETTE, B.A. *et al.* Welding-related parkinsonism: Clinical features, treatment, and pathophysiology. **Neurology**, v. 56, p. 8-13, 2001.

RIVERA-MANCÍA, S.; RÍOS, C.; MONTES, S. Manganese accumulation in the CNS and associated pathologies. **Biometals.** v. 24, p. 811-825, 2011.

ROSSANDER-HULTEN, L. *et al.* Competitive inhibition of iron absorption by manganese and zinc in humans. **Am J Clin Nutr.** v. 54, p. 152–156, 1991.

SAHNI, V. Case Report: A Metabolic Disorder Presenting as Pediatric Manganism. **Research Environmental Medicine**, v. 115, p. 1776-1779, 2007.

SANTANA, D.F. **Avaliação do potencial antidepressivo do manganês em animais submetidos ao modelo do nado forçado.** 2015. 38f. Monografia. Faculdade de Ceilândia – Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

SANCHEZ-BETANCOURT, J. *et al.* Manganese mixture inhalation is a reliable Parkinson disease model in rats. **Neurotoxicology.** v. 33, p. 1346–1355, 2012.

SANTAMARIA, A.B. Manganese exposure, essentiality & toxicity. **The Indian Journal of Medical Research**. v. 128,p. 484-500, 2008.

SANTAMARIA, A.B. *et al.* State-of-the-science review: does manganese exposure during welding pose a neurological risk? **Journal of Toxicology and Environmental Health**. Part B, v. 10, p. 417-465, 2007.

SANTOS, D. *et al.* The inhibitory effect of manganese on acetylcholinesterase activity enhances oxidative stress and neuroinflammation in the rat brain. **Toxicology**. v. 292, p. 90–98, 2012.

SINICROPI, M.S. *et al.* Chemical and biological properties of toxic metals and use of chelating agents for the pharmacological treatment of metal poisoning. **Archives in Toxicology**. v. 84, p. 501-520, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Biomarcadores na nefrologia. Disponível em: <<http://arquivos.sbn.org.br/pdf/biomarcadores.pdf>> Acesso em 13 de Nov. 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA. Minidicionário do Portador de Doença Hepática. Disponível em: <<http://www.sbhepatologia.org.br/dicionario-de-hepatologia>> Acesso em 13 de Nov. 2015.

SU, C. *et al.* Chronic exposure to manganese sulfate leads to adverse dose-dependent effects on the neurobehavioral ability of rats. **Environ Toxicol**. v. 10, 2015.

TAKEDA, A. Manganese action in brain function. **Brain Research Reviews**. v. 41, p. 79-87, 2003.

WARD, R. An update on disordered iron metabolism and iron overload. **Hematology**. v. 15, nº 5, p. 311-317. 2010.

WHO. World Health Organization. **Maganese its compounds**. Concise international chemical assessment document nº 12, Geneva, 1999.

WRIGHT, R.O.; BACCARELLI, A. Metals and Neurotoxicology. **The Journal of Nutrition**. v. 137, p. 2809-2813, 2007.

WU, L.J. *et al.* Expression of the iron transporter ferroportin in synaptic vesicles and the blood-brain barrier. **Brain Research**, v.1001, p.108-117, 2004.

YAMANISHI, H. *et al.* Evaluation of a model of latent pathologic factors in relation to serum ferritin elevation. **Clinical Biochemistry**. v. 40, p. 359–364, 2007.

YOU, S., WANG, Q. Ferritin in atherosclerosis. **Clinica Chimica Acta**. v. 357, p. 1-16. 2005.

Anexo I – Aprovação do Projeto em Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA)

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 6 de abril de 2015.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIDEPRESSIVO E TOXICOLÓGICO DO MANGANÊS EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DO NADO FORÇADO.**", UnBDoC n.º 33255/2015, sob responsabilidade do Professor José Eduardo Pandóssio foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Rattus norvegicus*: 50. A presente aprovação é válida pelo período de 10/5/2015 a 1/12/2015.

Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior
Coordenador da CEUA

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.